

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

## ヒトプリオン病の各臓器における prion seeding activity の検討

研究分担者：西田教行 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学分野  
 研究協力者：佐藤克也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科運動リハビリテーション学分野  
 研究協力者：高月英恵 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学分野  
 研究協力者：新竜一郎 宮崎大学医学部微生物学教室  
 研究協力者：布施隆行 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学分野  
 研究分担者：岩崎 靖 愛知医科大学加齢医科学研究所  
 研究協力者：吉田眞理 愛知医科大学加齢医科学研究所  
 研究分担者：高尾昌樹 脳血管研究所附属美原記念病院、東京都健康長寿医療センター研究所  
 研究協力者：美原 盤 脳血管研究所附属美原記念病院  
 研究協力者：村山繁雄 東京都健康長寿医療センター研究所

**研究要旨** プリオンの感染性あるいは感染価の評価は、マウスを用いた感染実験が主体である。感染実験の感度は相対的に高いが、6 か月以上の日数を要する。我々は試験管内で微量の異常型プリオン蛋白質を増幅する方法、Real-time quaking induced conversion (RT-QUIC) 法の開発に成功した<sup>1)</sup>。RT-QUI 法の評価は定性であったが、Endpoint dilution 法と RT-QUIC 法を組み合わせることで、プリオンのアミロイド形成能（シード活性）を 50% seeding dose (SD<sub>50</sub>)として定量的に評価することが可能となった<sup>2)</sup>。我々はこの方法をヒトサンプルにて評価することに成功した。本研究では、孤発性 CJD 患者より剖検時に採取した臓器（脳・脾臓・肝臓・腎臓・肺・副腎・消化管）の SD<sub>50</sub>を測定したところ、非神経系組織においても 10<sup>4</sup>-10<sup>7</sup>/g tissue のシード活性が存在することが明らかとなった。今後患者の全身の組織、体液について検討する必要があると思われる。

### A. 研究目的

医療行為によるプリオン病の感染を防ぐには、感染性プリオンの体内分布を明らかにすることが重要である。孤発性 CJD 患者の非神経系組織におけるシード活性を評価した。

### B. 研究方法

孤発性 CJD 患者より剖検時に採取した臓器（脳・脾臓・肝臓・腎臓・肺・副腎・消化管）の乳剤を段階希釈し RT-QUIC を行った。プリオンのシード活性の欠失する境界を定め、定量性を明確化するために Spearman-Kärber 法を用いて SD<sub>50</sub>を算出した。

#### （倫理面への配慮）

研究環境・生命倫理・安全対策に関わる全般を所掌する部門があり、人に関わる研究・動物実験を伴う研究・遺伝子組換え実験を伴う研究

のすべてが、機関長への申請の手続きを必要とする。機関長から付託された全学的メンバーで構成される各種実験審査委員会(倫理審査委員会、動物実験委員会、組換え DNA 実験委員会)において研究内容が審査され、研究環境・生命倫理・安全対策に問題がなく法律規則を順守していることが確認されたのちに、機関長から許可される体制が取られている。研究開始後は、人に関わる研究では毎年、動物実験を伴う研究及び遺伝子組換え実験を伴う研究では各機関が定める時期毎に、研究状況を機関長に報告することになっている。

### C. 研究結果

脳組織における SD<sub>50</sub>は 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> /g tissue であった。非中枢神経系組織においてもシード活性が 10<sup>4</sup>-10<sup>7</sup>/g tissue の範囲で検出された。同一臓器でも、症例によって陽性・陰性が分かれたが、

全症例とも多臓器で陽性となった。

#### D. 考察

動物における感染性プリオン病とは異なり、ヒトの孤発性 CJD 患者の各末梢臓器における感染性は検出限界以下とされてきた。SD<sub>50</sub>は動物試験による LD<sub>50</sub>に相関し、かつ検出能は100倍ほど高いと考えられ、孤発性 CJD 患者の臓器には微量ではあるが、感染性プリオンが存在する可能性が示唆された。

#### E. 結論

これまで孤発性 CJD の場合、感染性プリオンは中枢系に限局すると考えられてきたが、シード活性は末梢臓器にも存在し、高いものでは中枢の 1000 分の 1 になることから、低いながらも感染源になりうると考えられる。今後さらなる慎重な検討を要するが、RT-QUIC 法による検査は移植医療等の安全性向上に寄与しうると考えられる。

#### [参考文献]

- 1) Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 17:175-178, 2011.
- 2) Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Ishibashi D, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Atarashi R, Nishida N. Rapid and quantitative assay of amyloid-seeding activity in human brains affected with prion diseases. *PLoS One* 10:e0126930, 2015.
- 3) Wilham J M, Orrù CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog* 6:e1001217, 2010.
- 4) Takatsuki H, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Atarashi R, Nishida N, Satoh K. Prion-seeding activity is widely distributed in

tissues of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. *EBioMedicine* 12:150-155, 2016.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hayashi Y, Iwasaki Y, Takekoshi A, Yoshikura N, Asano T, Mimuro M, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. An autopsy-verified case of FTLN-TDP type A with upper motor neuron-predominant motor neuron disease mimicking MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Prion* 10:492-501, 2016.
- 2) Takatsuki H, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Atarashi R, Nishida N, Satoh K. Prion-seeding activity is widely distributed in tissues of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. *EBioMedicine* 12:150-155, 2016.
- 3) Hayashi Y, Yoshikura N, Takekoshi A, Yamada M, Asano T, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Inuzuka T. Preserved regional cerebral blood flow in the occipital cortices, brainstem, and cerebellum of patients with V180I-129M genetic Creutzfeldt-Jakob disease in serial SPECT studies. *J Neurol Sci* 370:145-151, 2016.
- 4) Schmitz M, Cramm M, Llorens F, Müller-Cramm D, Collins S, Atarashi R, Satoh K, Orrù CD, Groveman BR, Zafar S, Schulz-Schaeffer WJ, Caughey B, Zerr I. The real-time quaking-induced conversion assay for detection of human prion disease and study of other protein misfolding diseases. *Nat Protoc* 11:2233-2242, 2016.
- 5) Nakano Y, Akamatsu N, Mori T, Sano K, Satoh K, Nagayasu T, Miyoshi Y, Sugio T, Sakai H, Sakae E, Ichimiya K, Hamada M, Nakayama T, Fujita Y, Yanagihara K, Nishida N. Sequential washing with electrolyzed alkaline and acidic water effectively removes pathogens from metal surfaces. *PLoS One* 11:e0156058, 2016.
- 6) McGuire LI, Poggioli A, Poggiolini I, Suardi S, Grznarova K, Shi S, de Vil B, Sarros S, Satoh K, Cheng K, Cramm M, Fairfoul G, Schmitz M,

Zerr I, Cras P, Equestre M, Tagliavini F, Atarashi R, Knox D, Collins S, Haïk S, Parchi P, Pocchiari M, Green A. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: An international study. *Ann Neurol* 80:160-165, 2016.

7) Mori T, Atarashi R, Furukawa K, Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Nakagaki T, Ishibashi D, Ichimiya K, Hamada M, Nakayama T, Nishida N. A direct assessment of human prion adhered to steel wire using real-time quaking-induced conversion. *Sci Rep* 26:24993, 2016.

8) Cramm M, Schmitz M, Karch A, Mitrova E, Kuhn F, Schroeder B, Raeber A, Varges D, Kim YS, Satoh K, Collins S, Zerr I. Stability and reproducibility underscore utility of RT-QuIC for diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Mol Neurobiol* 53:1896-1904, 2016.

9) Schmitz M, Ebert E, Stoeck K, Karch A, Collins S, Calero M, Sklaviadis T, Laplanche JL, Golanska E, Baldeiras I, Satoh K, Sanchez-Valle R, Ladogana A, Skinningsrud A, Hammarin AL, Mitrova E, Llorens F, Kim YS, Green A, Zerr I. Validation of 14-3-3 protein as a marker in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease diagnostic. *Mol Neurobiol* 53:2189-2199, 2016.

10) Ishibashi D, Nakagaki T, Ishikawa T, Atarashi R, Watanabe K, Cruz FA, Hamada T, Nishida N. Structure-based drug discovery for prion

disease using a novel binding simulation. *EBioMedicine* 9:238-249, 2016.

11) Kawasaki M, Fuchigami T, Kobashi N, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Nishida N, Nakayama M. Development of radioiodinated acridine derivatives for in vivo imaging of prion deposits in the brain. *Bioorg Med Chem* 25:1085-1093, 2017

12) 佐藤克也. プリオン病の Case approach. 高尾昌樹 (編) 神経内科 Clinical Questions & pearls, 中外医学社, 東京, pp151-154, 2016.

## 2. 学会発表

1) Satoh K, Takatsuki H, Atarashi R, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Nishida N. Prion seeding activity is widely distributed in tissues of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. PRION 2016, Tokyo, 5.10-13, 2016.

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし